

REC'D 14 JAN 2000

PCT/JP99/06475

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.11.99

4
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年11月20日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第347785号

09/856371

出願人
Applicant(s):

扶桑薬品工業株式会社

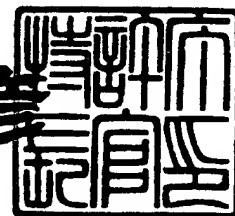
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3089681

【書類名】 特許願

【整理番号】 163444

【提出日】 平成10年11月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00
C07K 14/435
C07K 7/00
C12N 15/00
C12N 15/11
C12N 15/63
A61K 48/00
C12N 9/00
G01N 33/48

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼBSSP2

【請求項の数】 32

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133

【氏名】 植村 英俊

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ睦603号

【氏名】 奥井 文

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府阪南市自然田786-2

【氏名】 小南 勝也

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町2
85-79

【氏名】 山口 希

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区北白川西町 8 6 北白川コーポラス
202号

【氏名】 三井 真一

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 10 号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 (写) 1

【包括委任状番号】 9700672

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ BSSP2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に示すアミノ酸238個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項2】 配列番号1の塩基番号1～714に示す塩基配列、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項3】 配列番号4に示すアミノ酸273個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項4】 配列番号3の塩基番号247～1065に示す塩基配列、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項5】 配列番号6に示すアミノ酸311個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項6】 配列番号5の塩基番号516～1448に示す塩基配列、配

列番号 6 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 7】 配列番号 8 に示すアミノ酸 445 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 8 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 8】 配列番号 7 の塩基番号 116～1450 に示す塩基配列、配列番号 8 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 9】 配列番号 1 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 10】 配列番号 3 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号 3 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 11】 配列番号 5 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号 5 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 12】 配列番号 7 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号 7 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする

塩基配列。

【請求項13】 請求項2、4、6、8～12のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項14】 請求項2、4、6、8～12のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項15】 請求項2、4、6、8～12のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたBSSP2を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

【請求項16】 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項15記載の製造法。

【請求項17】 BSSP2遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項18】 BSSP2遺伝子がBSSP2をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項17記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項19】 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項17記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項20】 BSSP2遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

【請求項21】 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

【請求項22】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項21記載の抗体。

【請求項23】 ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 24】 BSSP2 またはその断片に対する抗体と BSSP2 またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の BSSP2 またはその断片を測定する方法。

【請求項 25】 hBSSP2 またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中の hBSSP2 またはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中の hBSSP2 もしくはその断片を測定する方法。

【請求項 26】 hBSSP2 またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化 hBSSP2 と検体中の hBSSP2 またはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化 hBSSP2 の量から検体中の hBSSP2 またはその断片の量を検出する、検体中の hBSSP2 またはその断片を測定する方法。

【請求項 27】 検体が体液である、請求項 24～26 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 28】 請求項 1、3、5 または 7 のいずれか 1 つに記載のタンパク質を含む、組織における疾患の診断マーカー。

【請求項 29】 脳におけるアルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項 31 記載のマーカー。

【請求項 30】 脳、前立腺または精巣における癌または炎症の診断に用いる請求項 28 記載のマーカー。

【請求項 31】 精液または精子における不妊症の診断に用いる請求項 28 記載のマーカー。

【請求項 32】 前立腺における前立腺肥大症の診断に用いる請求項 28 記載のマーカー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は単離されたセリンプロテアーゼ（本明細書においては「BSSP2」と称する）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変

種ならびにそれらの検出に関する。さらには、BSSP2タンパク質ならびにBSSP2ポリヌクレオチドおよびタンパク質の組成物、それらの製造方法および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

【0003】

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパク質は、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に参与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体（プロ体）のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、この様なタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

【0004】

例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

セリンプロテアーゼの至適 pH は、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に 30,000 以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

【0005】

最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR により多くの新規プロテアーゼの cDNA およびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamura ら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997)、Gschwend ら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997)、Chen ら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

特開平 9-149790 号の配列番号 3 には新規セリンプロテアーゼ (Neurosin) が開示されており、また Neurosin は Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997 にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いて Neurosin を大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

この様な状況の下、我々はマウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼ（以下、マウスのセリンプロテアーゼを mBSSP2、ヒトのセリンプロテアーゼを hBSSP2 と称する。）のクローニングに成功した。当該新規セリンプロテアーゼはタイプ 1、2 および 3 に分類することができ、タイプ 1 はアミノ酸 273 個から成り、タイプ 2 はアミノ酸 311 個から成り、タイプ 3 はアミノ酸 445 個から成ることを証明した。これらのアミノ酸配列中には成熟体セリンプロテアーゼとして N 末端側が Ile-Val-Gly-Gly-Gln-Ala-Val から始まる 238 個のアミノ酸配列を共通して含有していた。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸

配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含有されており、また、糖鎖結合部位に特有のアミノ酸配列が2カ所以上存在していることから、該アミノ酸配列から少なくとも糖鎖は2カ所以上存在しているものと予想される。

【0007】

ノザン・プロット解析の場合、15-20日目のマウス胎児の頭、生後3ヶ月のマウスの肺、前立腺および精巣で発現を示した(図1および図2参照)。RT-PCR解析の場合においては、生後12日の脳および精巣で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、肺および精巣において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病(AD)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。さらに、本発明の新規セリンプロテアーゼの阻害剤は、アルツハイマー病、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および予防に用いることができる。

【0008】

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準(Mckhann, G. et al.; Neurology, 34, 939, 1994)または、DSM-IVの診断基準(American Psychiatric Association; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994)に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

【0009】

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

【0010】

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A β およびその前駆体タンパク質である β APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

【0011】

本発明の新規セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担ってい

と考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

【0012】

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-P A) がある。U-P Aはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素およびコラゲナーゼ等が知られている。

【0013】

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等にご利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク質 (A F P) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タン

パク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2 は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と 78% の相同性を有しており、PSA も前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998. Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997. Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997. Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。さらに、hK2 は前立腺癌のマーカーだけでなく、胃癌のマーカーとしても有用であることが報告されている (Cho, J. Y. et al. ; Cancer, 79, 878, 1997)。その他、血清中サイトケラチン 19 フラグメントを測定するシフラ (CYFRA 21-1) は肺癌に対して有用な腫瘍マーカーであること (Sugiyama, Y. et al. ; Japan J. Cancer Res., 85, 1178, 1994)、ガストリン放出ペプチド前駆体 (ProGRP) が肺小細胞癌に対して有用な腫瘍マーカーであること (Yamaguchi, K. et al. ; Japan, J. Cancer Res., 86, 698, 1995) が報告されている。

【0014】

ゆえに、本発明は、脳、肺、前立腺および精巣等の各種組織において、アルツハイマー病 (AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供する。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明の一つの態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ BSSP 2 のアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号 2 に示すアミノ酸 238 個から成るアミノ酸配列 (成熟型 BSSP 2 (配列番号 2)) および該アミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列

番号1、塩基番号1～714)である。また、実質的に配列番号2に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体(カルシウム付加体など)、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

なお、以下に示す配列表中の塩基配列中における「n」記号は、通常の核酸塩基、アデニン(a)、シトシン(c)、グアニン(g)、チミン(t)のいずれかがその位置があることを、アミノ酸配列中における「Xaa」は、20種の天然に存在するいずれかのアミノ酸がポリペプチド配列その位置にあることを意味する。

【0016】

本発明の別の態様は、成熟体BSSP2アミノ酸配列(配列番号2)のN末端側に、配列番号4に示す-35から-1までの35個のアミノ酸が付加された、アミノ酸273個から成るアミノ酸配列(タイプ1BSSP2(配列番号4))および該アミノ酸をコードする塩基配列(配列番号3、塩基番号247～1065)である。また、実質的に配列番号4に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0017】

本発明の別の態様は、成熟体BSSP2アミノ酸配列(配列番号2)のN末端側に、配列番号6に示す-73から-1までの73個のアミノ酸が付加された、アミノ酸311個から成るアミノ酸配列(タイプ2BSSP2(配列番号6))および該アミノ酸をコードする塩基配列(配列番号5、塩基番号516～1448)である。また、実質的に配列番号6に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸

配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0018】

本発明の別の態様は、成熟体BSSP2アミノ酸配列（配列番号2）のN末端側に、配列番号8に示す-207から-1までの207個のアミノ酸が付加された、アミノ酸445個から成るアミノ酸配列（タイプ3BSSP2（配列番号8））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号7、塩基番号116~1450）である。また、実質的に配列番号8に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

また、本発明は、配列番号1、3、5および7に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP2、hBSSP2、mBSSP2には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明のBSSP2をコードする塩基配列は、BSSP2を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法（Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979）等を用いることができる。全RNAからのポリ（A）+RNAの調製はオリゴ（dT）を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ（A）鎖に相補的なオリゴ（dT）またはランダムプライマーあるいはBSSP2のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNA

に相補的なDNAもしくはcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ (E. coli) RNase H、イー・コリ DNAポリメラーゼ1、イー・コリ DNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0020】

BSSP2 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、BSSP2 発現細胞ポリ (A) + RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、BSSP2 遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。ヒトおよびラットのBSSP2についても同様の手法によりcDNAの取得が可能である。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Matt encci, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

【0021】

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4、6および8のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2、4、6および8のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号2に示すBSSP2成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

【0022】

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

【0023】

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Graham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, 43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる。

【0024】

さらに、配列番号1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列を含む塩基配列またはそれらに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明によるBSSP2と同等の性質を有する限り、そのDNAは本発明によるDNAに含有される。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジェントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液 (0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP)、0.5% SDSおよび20μg/ml変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて0.1% SDS含有2×SSCで洗浄する条件である。SSCの代わりに適宜SSPEを使用してもよい。

【0025】

配列番号1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、BSSP2遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定すること

ができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

【0026】

さらに、本発明が提供するBSSP2のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するBSSP2遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5' 非翻訳領域、または3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

【0027】

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号5に示す塩基配列もしくは配列番号6のアミノ酸配列をコードする塩基配列、または配列番号7に示す塩基配列もしくは配列番号8のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはこれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

【0028】

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/19、PfasterBAC1 (GIBCO社製)等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばpSecTag2Aベクター、pSecTag2Bベクター (Invitrogen社)を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル塩基配列と、その3'下流側に、Tag塩基配列、切断可能塩基配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする塩基配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター (本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け特許出願明細書)を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、Tag塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする塩基配列 (当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。)を用いることが好ましい。

【0029】

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞 (微生物を含む) が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeL

a細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、High FiveTM（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

【0030】

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

【0031】

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたBSSP2を採取する、BSSP2の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

【0032】

本発明は、BSSP2遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、BSSP2遺伝子とは、BSSP2をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写

と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、BSSP2の機能あるいは発現調節の研究、BSSP2が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

【0033】

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、BSSP2の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0034】

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989)。あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の FLP リコンビナーゼ系等による *in vivo* における部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0035】

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス (5~6 週齢)、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

【0036】

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物 (偽妊娠雌マウス等) を用意し、一匹に対して約 10~15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺

伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

【0037】

本発明のノックアウトマウスは、マウスBSSP2遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

【0038】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞が発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

【0039】

本発明はまた、BSSP2またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4、6および8のいずれかに記載のアミノ酸配

列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。BSSP2またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のBSSP2あるいはBSSP2の断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0040】

本発明のBSSP2またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

【0041】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化BSSP2と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法（Nature, 256, 495, 1975）やその変法（J. Immunol. Method, 39, 285, 1980、Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981、Nature, 285, 446, 1980）に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

【0042】

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20~20:1であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）を10~80%程度の濃度で添加し、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗BSSP2抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、BSSP2抗原を直接または担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗BSSP2モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したBSSP2を加え、固相に結合した抗BSSP2モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

【0043】

抗BSSP2モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗BSSP2抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ま

しい。

【0044】

ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

【0045】

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0~20%のFCSを含む細胞培養用培地(IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹

腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

【0046】

本発明によるモノクローナル抗体は、BSSP2に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとしてすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2、4、6または8のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるBSSP2特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2、4、6および8に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP2ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

【0047】

抗BSSP2モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 α -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンお

よびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 β -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

【0048】

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0049】

BSSP2 またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、BSSP2 を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のBSSP2 またはその断片との免疫学的な結合に基づき、BSSP2 またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてBSSP2 もしくはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりBSSP2 もしくはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化BSSP2 と検体中のBSSP2 もしくはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のBSSP2 もしくはその断片を測定する競合法を利用して検体中のBSSP2 もしくはその断片を測定する方法が挙げられる。

【0050】

サンドイッチ法によるBSSP2 もしくはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とBSSP2 もしくはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-BSSP2 標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびBSSP2 もしくはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

【0051】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0052】

抗体の固着化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ

レートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固着化させておいて捕捉することも可能である。

【0053】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

【0054】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として 2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン- β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

【0055】

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えば Fab', Fab, F(ab')₂ を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、BSSP 2 もしくはその断片を含む試料または BSSP 2 の前駆体もしくはその断片を含む試料であれば限定されない。

【0056】

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分と言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

配列番号2に示すアミノ酸配列はアミノ酸238個から成るBSSP2成熟型あるいは活性型タンパク質であり、これをコードする配列番号1に示す塩基配列は塩基数714個から成る。本発明者らは本発明の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号2に示すものが好ましい。

【0057】

配列番号4に示すアミノ酸配列はアミノ酸273個から成るタイプ1BSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号3に示す塩基配列は塩基数1685個から成る。アミノ酸番号-35～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号4に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号6に示すアミノ酸配列はアミノ酸311個から成るタイプ2BSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号5に示す塩基配列は塩基数2068個から成る。アミノ酸番号-73～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号6に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

【0058】

配列番号8に示すアミノ酸配列はアミノ酸445個から成るタイプ3BSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号7に示す塩基配列は塩基数2070個から成る。アミノ酸番号-207～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号8に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号4、6および8中には共通なアミノ酸配列として配列番号2に示した成熟型BSSP2タンパク質を含有しており、さらに、配列番号4、6および8

のそれぞれのアミノ酸番号-25~238は共通配列として存在している。

【0059】

【実施例】

実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社) を鋳型にして、プライマー配列 1; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG、2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GAに示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する核酸配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5 μ l、10 \times ExTaqバッファを5 μ l、dNTPを5 μ l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製) を0.5 μ l 加え滅菌水で全量を50 μ l とし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで30回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット (Invitrogen社) 添付のpCR I I-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (amp+)プレートに播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクローン、BSSB2遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP2クローン特異プライマーを作製し、mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を用いてこの試薬に付属するAP1プライマーとGSP1プライマーで94 $^{\circ}$ C、2分を1サイクル、94 $^{\circ}$ C、30秒、60 $^{\circ}$ C、30秒、72 $^{\circ}$ C、30秒を35サイクルするPCRを行った。次に、このPCR産物を1/100に希釈したものを5 μ l、10 \times バッファを5 μ l、dNTPを5 μ l、10 μ MのGSP2プライマーを10 pmol、AP2プライマーを10 pmol、ExTaqを0.5ユニット、滅菌水で全量を50 μ l とし、先と同様にPCRを行った。このPCR産物を上記TOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に

基づいて下記に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にして cDNA 全長を増幅できるような下記に示すプライマーを作製し、mouse Marathon ready brain cDNA を鋳型として PCR を行い同一クローンであることを確認し、これを TOPO TA クローニングキットに添付の pCR II-TOPO ベクターにクローニングし、全長の cDNA クローンが入ったプラスミド pCR II / mBSSP2 を得た。

【0060】

クローン	プライマー名	向き	配列	用途
mouse BSSP2	mBSSP2.0	Forward	ATGGTGGAGAAGATCATTCCT	RACE
	mBSSP2.1	Forward	TACAGTGGCCAGAACCATG	RACE
	mBSSPF4	Forward	CTCAACTCTCTGCTAGACCG	RACE
	mBSSP2F5	Forward	ATAGTTGGCGGCCAAGCTGT	mature
	mBSSPF7	Forward	CCCAGCAGAACTTACTGCCT	全長用
	mBSSP2.2	Reverse	TGTTGCAGAGGTGGGTGCTG	RACE
	mBSSP2R2	Reverse	TACCATTGTGTCCTGCAGTGT	RACE
	mBSSP2R5/E	Reverse	TGAATTCTGCTGCTTCTTCGGCTAGCG	全長用

【0061】

実施例 2 mBSSP2 遺伝子のマウス臓器での発現

Balb/c マウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNA を単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターを pCR II / mBSSP2 より mBSSP2 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 α - 32 P dCTP で標識したプローブを $5\times$ SSC で希釈したものと、 65°C で一昼夜反応させた。その後、このフィルターを $2\times$ SSC / 0.1% SDS で室温 30 分間、 $1\times$ SSC / 0.1% SDS で室温 30 分間、 $0.1\times$ SSC / 0.1% SDS で 65°C 30 分間で 2 回洗い、FLA 2000 用イメージングプレート (富士フィルム社) に 1 日露光させ、解析した。マウス胎児の頭から調製した mRNA、生後 5 日、10 日、14 日、18 日、30 日、3 ヶ月、7 ヶ月、1 年のマウスの脳から調製した mRNA (図 1)、お

よび、生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製したmRNA(図2)を用いて行った結果を示す。また上記で作製したマウスmRNAをReady To Go RT-PCR Beads(Amersham-Pharmacia)を用いてキット添付のプロトコール通りにmBSSP2に対してはRT-PCRを行った。図1および図2から、mBSSP2はノザンプロット解析の場合、15-20日目の胎児の頭で発現を示し、生後3ヶ月のマウスでは、前立腺および精巣で発現を示すことが認められた。またRT-PCRの結果、生後12日の脳および生後3ヶ月の精巣で発現が認められた。

【0062】

実施例3 mBSSP2 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の発現

(1) 発現プラスミドの構築

プラスミドpCR II/mBSSP2をテンプレートに、BSSP2タンパク質の成熟体をコードするcDNA領域をPCR反応にて増幅した。このPCR産物をpTrc-His B(Invitrogen)をBamHIで消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌DH5 α を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミドpTrcHis/mBSSP2を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、E. coli pTrcHis/mBSSP2と命名し、1998年10月29日より、受託番号FERM P-17033の下、工業技術院生命工学工業技術研究所に委託してある。

【0063】

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを10mlのLB(Amp+)培地に接種し、一晚37℃で培養した。これを250mlのLB(Amp+)培地に接種し、37℃で培養した。600nmの吸光度が0.5になった時、250 μ lの0.1M IPTG(イソプロピルー β -D(-)チオガラクトピラノシド)を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー(10mM リン酸バッファー pH7.5、1mM EDTA)で懸濁し、氷上で超音

波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファーで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファー（8M 尿素、50mM Tris pH8.5、20mM 2ME）で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin (Clontech)に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物をPBSに対して一晩おきにバッファー交換しながら3日間透析し、タンパク質mBSSP2-Hisを得た。

【0064】

実施例4 mBSSP2 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/BSSP2を用いた発現

(1) pFBTrypSigTag/BSSP2の作製

配列番号9と10をアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A (Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ（宝酒造）を加えて室温（25℃）で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase（宝酒造）を加えて65℃で30分反応した。

【0065】

特開平9-14790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、pSPORT/ニューロシンをクローニングした。pSPORT/ニューロシンより、配列番号11および12を用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARA ライゲ

ーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た(図3)。

【0066】

配列番号13及び14によりpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号14及び15によって増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した(図4A)。

【0067】

pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号12と16を用いたPCRによって作製したcDNAをBgIIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号12と17を用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。

【0068】

5 μ gのpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

【0069】

E. coli pTrcHis/mBSSP2(寄託番号FERM P-17033)から調製したpTrcHis/mBSSP2またはpCRII/hBSSP6を用い、通常の方法でPCRを行い、mBSSP2の活性体領域のcDNAを得た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTr

y p S i g T a g / m B S S P 2を得た(図4B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しくmBSSP2が挿入されているかを確認した。

【0070】

p F B T r y p S i g T a g / m B S S P 2をGibco BRL BAC-TO-BAC baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、His tag、及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP2を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウィルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

【0071】

酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質mBSSP2をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファーを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾール(和光純薬工業)を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム(Pharmacia社製)でPBSバッファーに交換した。このサンプル50 μ Lにエンテロキナーゼ(1U/1 μ L, Invitrogen社製)10 μ Lを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質(ペプチド研究所)をDMSOに溶解し、1M Tris-HCl, (pH8.0)で希釈した0.2M基質溶液を50 μ L加え、さらに、37 $^{\circ}$ Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC(7-アミノ-4-メチルクマリン)の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

【配列表】

<110> Fuso Yakuhin Kogyo Kabushikigaisya

<120> Novel serine protease BSSP2

<130> 163444

<160> 17

<210> 1

<211> 717

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa gct agc	51
Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser	
1 5 10 15	
gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca cca cac	102
Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His	
20 25 30	
tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc cgc cta	153
Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu	
35 40 45 50	
tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc cga caa	204
Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln	
55 60 65	
cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac agt gcc	255

His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala
70 75 80 85
cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca atc aac 306
Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn
90 95 100
ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag tac ttt 357
Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe
105 110 115
cca tgg ggg tgc cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac ccc agc 408
Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser
120 125 130 135
cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg ctc agc 459
His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser
140 145 150
acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca cac cgc 510
Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg
155 160 165 170
atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag gga gac 561
Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp
175 180 185
agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt gta ggg 612
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly
190 195 200
gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt gtc tat 663
Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr
205 210 215 220
gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag gtc cgc 714
Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg
225 230 235

tag

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser

1 5 10 15

Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His

20 25 30

Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu

35 40 45 50

Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln

55 60 65

His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala

70 75 80 85

Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn

90 95 100

Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe

105 110 115

Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser

120 125 130 135

His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser

140 145 150

Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg

155 160 165 170

Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp

175 180 185
 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly
 190 195 200
 Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr
 205 210 215 220
 Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg
 225 230 235

<210> 3

<211> 1685

<212> DNA

<213> mouse

<400> 3

ctcacatgta tctttcagaa taaatggaga ggatcttctg cttcaagtac aagtaagagc 60
 tcggccagac tggctcctgg tatgccatga gggccggagc ccagccctgg gcatgcacat 120
 ctgcaagagt cttgggcata tcaggcttac tcaacacaag gccgtgaatc tgtctgacat 180
 caagctcaac agatcccagg agtttgctca actctctgct agaccgggag gccttgtaga 240
 ggaggc atg gaa gcc cag gta ggg ctt ctg tgg gtt agc gct aac tgt cct 291
 Met Glu Ala Gln Val Gly Leu Leu Trp Val Ser Ala Asn Cys Pro
 -35 -30 -25
 tct ggc cga att gtt tct ctc aaa tgt tct gag tgt ggg gca agg cct ctg 342
 Ser Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu
 -20 -15 -10 -5
 gct tct cga ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg 393
 Ala Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp
 -1 1 5 10
 caa gct agc gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg 444
 Gln Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu

15	20	25	30	
gca cca cac tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg				495
Ala Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu				
35	40	45		
tcc cgc cta tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct				546
Ser Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala				
50	55	60	65	
gtc cga caa cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg				597
Val Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu				
70	75	80		
tac agt gcc cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca				648
Tyr Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr				
85	90	95		
cca atc aac ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag				699
Pro Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu				
100	105	110	115	
cag tac ttt cca tgg ggg tgc cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc				750
Gln Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr				
120	125	130		
gac ccc agc cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc				801
Asp Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro				
135	140	145	150	
ctg ctc agc acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt				852
Leu Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu				
155	160	165		
aca cac cgc atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc				903
Thr His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys				
170	175	180		
cag gga gac agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac				954

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His
 185 190 195 200
 ctt gta ggg gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca 1005
 Leu Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro
 205 210 215
 ggt gtc tat gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg 1056
 Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val
 220 225 230 235
 cag gtc cgc tagccgaaga agcagcagca gccacctgtg acgccgagct gtggatcgcc 1115
 Gln Val Arg

catggatcac cccagtctgg gggccagcat ctgggtcact gggcctctcc ccaaaggctc 1175
 tgacttcgag ttcatctttc tcacttgaga acctccacaa caggaaaagg agtctgcggc 1235
 tagattggga atgatggtga gaggaaggga taggaggaca gaagagacag cagaggcttc 1295
 tggaagcatc tgggagactg ctctctgtct cccccacac cccacgtgca tccactgggg 1355
 gatgctggag atgccaatc cttgtttctt gtggggccac tggaaggcta agtccaactt 1415
 tagaggatgc cctgtctcga gagttactag gcagataagg ttaagggttg acaagctcag 1475
 gtaaaggcac ggaagtcaag atcccccttc ccccgctcgg tcctgttctg aggtaagcta 1535
 atagccccgc accaggcaga ggtctacagg gtaagaagga tgcagttggg ctacacgacg 1595
 ctatitttca aatgatgttt ctgtaaattg gttgagagag ttttgttatt aaacagaaat 1655
 tatgtataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1685

<210> 4

<211> 273

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Met Glu Ala Gln Val Gly Leu Leu Trp Val Ser Ala Asn Cys Pro

-35

-30

-25

Ser Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu
 -20 -15 -10 -5
 Ala Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp
 -1 1 5 10
 Gln Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu
 15 20 25 30
 Ala Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu
 35 40 45
 Ser Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala
 50 55 60 65
 Val Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu
 70 75 80
 Tyr Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr
 85 90 95
 Pro Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu
 100 105 110 115
 Gln Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr
 120 125 130
 Asp Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro
 135 140 145 150
 Leu Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu
 155 160 165
 Thr His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys
 170 175 180
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His
 185 190 195 200
 Leu Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro
 205 210 215
 Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val

220	225	230	235
Gln Val Arg			
<210> 5			
<211> 2068			
<212> DNA			
<213> mouse			
<400> 5			
ctggctgggc	tgttgaatca	atcccgacat	gaggacagga gcctcaccct gccagcaga 60
acttactgcc	ttatatcagt	gcagctgact	catatgagtc caacactgga tgaccaaagc 120
ccaatggaga	ttcgggtgcac	ggaagagggt	gctgggcctg ggatcttcag aatggagttg 180
ggagaccaga	ggcaatccat	ttctcagtc	caacgctggt gctgcctgca acgtggctgt 240
gtaatactgg	gcgtcctggg	gctgctggct	ggagcaggca ttgcttcag gctcttagtg 300
ttgtatctat	ggccggctgc	ctctccatcc	atctctggga cgttgcagga ggaggagatg 360
actttgaact	gtccaggagt	gagctgtgag	gaagagctcc ttccatctct tccaaaaca 420
gaataaatgg	aggggatctt	ctgcttcaag	tacaagtaag agctcggcca gactggctcc 480
tggtctgcca	tgagggtgg	agccccgcc	tgggc atg cac atc tgc aag agt ctt 536
Met His Ile Cys Lys Ser Leu			
-70			
ggg cat atc	agg ctt act	caa cac aag	gcc gtg aat ctg tct gac atc aag 587
Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu Ser Asp Ile Lys			
-65	-60	-55	-50
ctc aac aga	tcc cag gag	ttt gct caa	ctc tct gct aga ccg gga ggc ctt 638
Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg Pro Gly Gly Leu			
-45	-40	-35	
gta gag gag	gca tgg aag	ccc agc gct	aac tgt cct tct ggc cga att gtt 689
Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser Gly Arg Ile Val			
-30	-25	-20	
tct ctc aaa	tgt tct gag	tgt ggg gca	agg cct ctg gct tct cga ata gtt 740

Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala Ser Arg Ile Val
-15 -10 -5 -1 1
ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa gct agc gtg atg 791
Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Met
5 10 15
ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca cca cac tgg gta 842
Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His Trp Val
20 25 30 35
gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc cgc cta tcc agc 893
Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu Ser Ser
40 45 50
tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc cga caa cac cag 944
Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln His Gln
55 60 65 70
gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac agt gcc cag aac 995
Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn
75 80 85
cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca atc aac ttc tca 1046
His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn Phe Ser
90 95 100
gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag tac ttt cca tgg 1097
Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe Pro Trp
105 110 115 120
ggg tcg cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac ccc agc cat act 1148
Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser His Thr
125 130 135
cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg ctc agc acc cac 1199
His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser Thr His
140 145 150 155

ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca cac cgc atg ttg 1250
 Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg Met Leu
 160 165 170
 tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag gga gac agc ggg 1301
 Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 175 180 185
 gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt gta ggg gtg gtc 1352
 Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly Val Val
 190 195 200 205
 agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt gtc tat gcc aag 1403
 Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Lys
 210 215 220
 gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag gtc cgc tagccga 1455
 Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg
 225 230 235
 agaagcagca gcagccacct gtgacgccga gctgtggatc gcccatggat caccaccagtc 1515
 tggggggccag catctgggtc actgggcctc tcccaaagg ctctgacttc gagttcatct 1575
 ttctcatctg agaacctcca caacaggaaa aggagtctgc ggctagattg ggaatgatgg 1635
 tgagaggaag ggataggagg acagaagaga cagcagaggc ttctggaagc atctgggaga 1695
 ctgctcctct gctcccccca caccaccagt gcatccactg ggggatgctg gagatgcccc 1755
 atccttgttt cttgtggggc cactggaagg ctaagtccaa ctttagagga tgccctgtct 1815
 cgagagttac taggcagata aggttaaggt tggacaagct caggtaaagg cacggaagtc 1875
 aagatccctt ctccccgtg cggtcctgtt ctgaggtaag ctaatagccc cgcaccaggc 1935
 agaggcttac agggtaagaa ggatgcagtt gggctacacg acgctatitt tcaaatgatg 1995
 ttctgtaaa ttggttgaga gagttttgtt attaaacaga aattatgtat aaaaaaaaaa 2055
 aaaaaaaaaa aaa 2068

<210> 6

<211> 311

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Met His Ile Cys Lys Ser Leu

-70

Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu Ser Asp Ile Lys

-65

-60

-55

-50

Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg Pro Gly Gly Leu

-45

-40

-35

Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser Gly Arg Ile Val

-30

-25

-20

Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala Ser Arg Ile Val

-15

-10

-5

-1 1

Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Met

5

10

15

Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His Trp Val

20

25

30

35

Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu Ser Ser

40

45

50

Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln His Gln

55

60

65

70

Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn

75

80

85

His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn Phe Ser

90

95

100

Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe Pro Trp

105

110

115

120

Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser His Thr

125

130

135

His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser Thr His
 140 145 150 155
 Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg Met Leu
 160 165 170
 Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 175 180 185
 Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly Val Val
 190 195 200 205
 Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Lys
 210 215 220
 Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg
 225 230 235

<210> 7

<211> 2070

<212> DNA

<213> mouse

<400> 7

cccagcagaa cttactgcct tatatcagtg cagctgactc atatgccctg gtgtggggct 60
 gctggatctt caaccactat ttctccagag tccaacactg gatgaccaaaa gccca atg 118
 Met

gag att cgg tgc acg gaa gag ggt gct ggg cct ggg atc ttc aga atg gag 169
 Glu Ile Arg Cys Thr Glu Glu Gly Ala Gly Pro Gly Ile Phe Arg Met Glu
 -205 -200 -195 -190
 ttg gga gac cag agg caa tcc att tct cag tcc caa cgc tgg tgc tgc ctg 220
 Leu Gly Asp Gln Arg Gln Ser Ile Ser Gln Ser Gln Arg Trp Cys Cys Leu
 -185 -180 -175

caa cgt ggc tgt gta ata ctg ggc gtc ctg ggg ctg ctg gct gga gca ggc 271
 Gln Arg Gly Cys Val Ile Leu Gly Val Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ala Gly
 -170 -165 -160
 att gct tca tgg ctc tta gtg ttg tat cta tgg cca gct gcc tct cca tcc 322
 Ile Ala Ser Trp Leu Leu Val Leu Tyr Leu Trp Pro Ala Ala Ser Pro Ser
 -155 -150 -145 -140
 atc tct ggg acg ttg cag gag gag gag atg act ttg aac tgt cca gga gtg 373
 Ile Ser Gly Thr Leu Gln Glu Glu Glu Met Thr Leu Asn Cys Pro Gly Val
 -135 -130 -125
 agc tgt gag gaa gag ctc ctt cca tct ctt ccc aaa aca gta tct ttc aga 424
 Ser Cys Glu Glu Glu Leu Leu Pro Ser Leu Pro Lys Thr Val Ser Phe Arg
 -120 -115 -110 -105
 ata aat gga gag gat ctt ctg ctt caa gta caa gta aga gct cgg cca gac 475
 Ile Asn Gly Glu Asp Leu Leu Leu Gln Val Gln Val Arg Ala Arg Pro Asp
 -100 -95 -90
 tgg ctc ctg gtc tgc cat gag ggc tgg agc ccc gcc ctg ggc atg cac atc 526
 Trp Leu Leu Val Cys His Glu Gly Trp Ser Pro Ala Leu Gly Met His Ile
 -85 -80 -75
 tgc aag agt ctt ggg cat atc agg ctt act caa cac aag gcc gtg aat ctg 577
 Cys Lys Ser Leu Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu
 -70 -65 -60 -55
 tct gac atc aag ctc aac aga tcc cag gag ttt gct caa ctc tct gct aga 628
 Ser Asp Ile Lys Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg
 -50 -45 -40
 ccg gga ggc ctt gta gag gag gca tgg aag ccc agc gct aac tgt cct tct 679
 Pro Gly Gly Leu Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser
 -35 -30 -25 -20
 ggc cga att gtt tct ctc aaa tgt tct gag tgt ggg gca agg cct ctg gct 730
 Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala

-15	-10	-5	
tct cga ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa	781		
Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln			
-1 1 5 10 15			
gct agc gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca	832		
Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala			
20 25 30			
cca cac tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc	883		
Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser			
35 40 45			
cgc cta tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc	934		
Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val			
50 55 60 65			
cga caa cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac	985		
Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr			
70 75 80			
agt gcc cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca	1036		
Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro			
85 90 95 100			
atc aac ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag	1087		
Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln			
105 110 115			
tac ttt cca tgg ggg tcg cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac	1138		
Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp			
120 125 130			
ccc agc cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg	1189		
Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu			
135 140 145 150			
ctc agc acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca	1240		

Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr
 155 160 165
 cac cgc atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag 1291
 His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln
 170 175 180 185
 gga gac agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt 1342
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu
 190 195 200
 gta ggg gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt 1393
 Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly
 205 210 215
 gtc tat gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag 1444
 Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln
 220 225 230 235
 gtc cgc tagccgaaga agcagcagca gccacctgtg acgccgagct gtggatcgcc 1500
 Val Arg

catggatcac cccagtctgg gggccagcat ctgggtcact gggcctctcc ccaaaggctc 1560
 tgacttcgag ttcattcttc tcatctgaga acctccacaa caggaaaagg agtctgcggc 1620
 tagattggga atgatggtga gaggaaggga taggaggaca gaagagacag cagaggcttc 1680
 tggaagcatc tgggagactg ctccctctgct cccccacac cccacgtgca tccactgggg 1740
 gatgctggag atgcccaatc ctgttttctt gtggggccac tggaaggcta agtccaactt 1800
 tagaggatgc cctgtctcga gagttactag gcagataagg ttaaggttgg acaagctcag 1860
 gtaaaggcac ggaagtcaag atcccccttc ccccgtcggg tcctgttctg aggtaagcta 1920
 atagccccgc accaggcaga ggtctacagg gtaagaagga tgcagttggg ctacacgacg 1980
 ctatittttca aatgatgttt ctgtaaattg gttgagagag ttttgttatt aaacagaaat 2040
 tatgtataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2070

<210> 8

<211> 445

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Met

Glu Ile Arg Cys Thr Glu Glu Gly Ala Gly Pro Gly Ile Phe Arg Met Glu			
-205	-200	-195	-190
Leu Gly Asp Gln Arg Gln Ser Ile Ser Gln Ser Gln Arg Trp Cys Cys Leu			
-185	-180	-175	
Gln Arg Gly Cys Val Ile Leu Gly Val Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ala Gly			
-170	-165	-160	
Ile Ala Ser Trp Leu Leu Val Leu Tyr Leu Trp Pro Ala Ala Ser Pro Ser			
-155	-150	-145	-140
Ile Ser Gly Thr Leu Gln Glu Glu Glu Met Thr Leu Asn Cys Pro Gly Val			
-135	-130	-125	
Ser Cys Glu Glu Glu Leu Leu Pro Ser Leu Pro Lys Thr Val Ser Phe Arg			
-120	-115	-110	-105
Ile Asn Gly Glu Asp Leu Leu Leu Gln Val Gln Val Arg Ala Arg Pro Asp			
-100	-95	-90	
Trp Leu Leu Val Cys His Glu Gly Trp Ser Pro Ala Leu Gly Met His Ile			
-85	-80	-75	
Cys Lys Ser Leu Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu			
-70	-65	-60	-55
Ser Asp Ile Lys Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg			
-50	-45	-40	
Pro Gly Gly Leu Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser			
-35	-30	-25	-20
Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala			

	-15	-10	-5
Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln			
-1 1	5	10	15
Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala			
20	25	30	
Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser			
35	40	45	
Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val			
50	55	60	65
Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr			
70	75	80	
Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro			
85	90	95	100
Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln			
105	110	115	
Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp			
120	125	130	
Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu			
135	140	145	150
Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr			
155	160	165	
His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln			
170	175	180	185
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu			
190	195	200	
Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly			
205	210	215	
Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln			
220	225	230	235

Val Arg

<210> 9

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 9

AAG CTT GGC TAG CAA CAC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CCT TAC CTT TGT TGC 51
TGC TGC TGT TGC TGC CCC CTT TGA CGA CGA TGA CAA GGA TCC GAA TTC

<210> 10

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 10

GAA TTC GGA TCC TTG TCA TCG TCG TCA AAG GGG GCA GCA ACA GCA GCA GCA 51
ACA AAG GTA AGG ATC AGG AGT AGA TTC ATG GTG TTG CTA GCC AAG CTT 99

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 11

TTG GTG CAT GGC GGA

15

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 12

TCC TCG AGA CTT GGC CTG AAT GGT TTT

27

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 13

GCG CTA GCA GAT CTC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CC

35

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 14

TGA AGC TTG CCA TGG ACC AAC TTG TCA TC

29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 15

CCA AGC TTC ACC ATC ACC ATC ACC AT

26

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 16

GCA CAG TCG AGG CTG AT

17

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 17

CAA ATG TGG TAT GGC TG

17

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 2 におけるマウスから調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図 2】 実施例 2 におけるマウスから調製した mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図 3】 実施例 4 の方法により構築したプラスミド。

【図 4】 実施例 4 の方法によるプラスミド pFBTrypSigTag/BSSP2 の構築図。

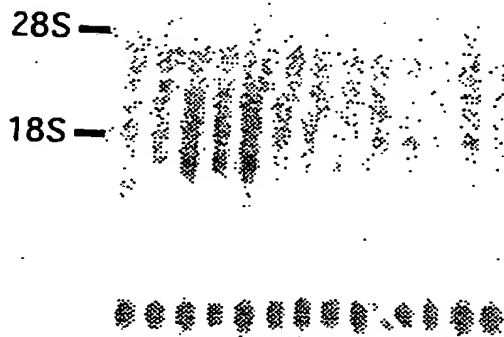
【書類名】

図面

【図1】

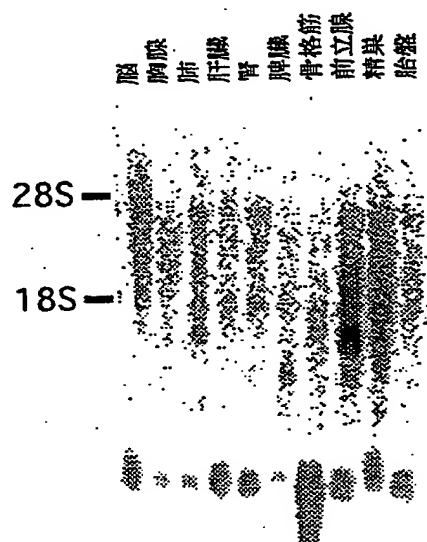
mBSSP-2

胎児					生後				
血	血	血	血	血	血	血	血	血	血
9	13	15	18	20	5	10	14	18	30
1	1	1	1	2					3
									7
									年

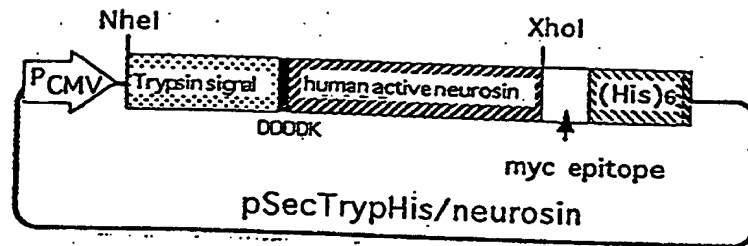


【図 2】

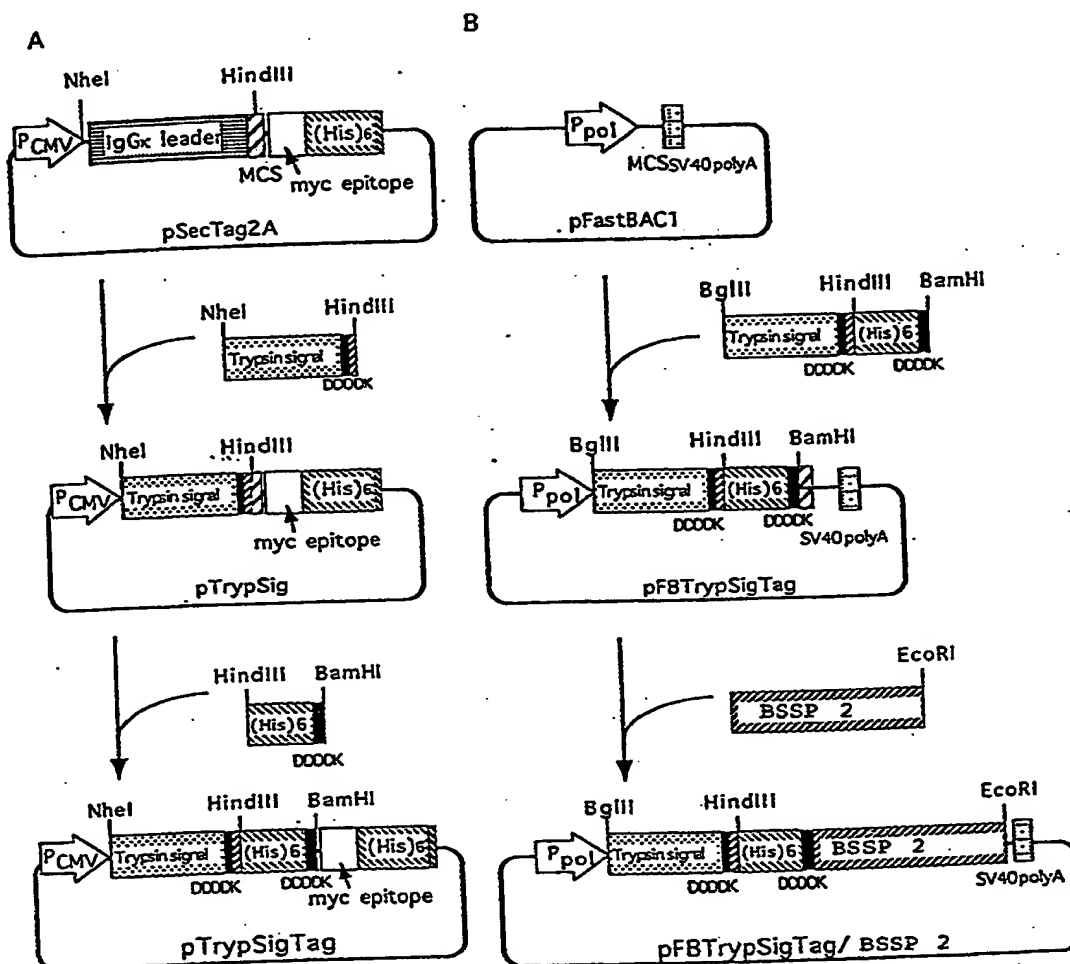
mBSSP-2



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼ (BSSP2) を提供する。

【解決手段】 配列番号2、4、6および8に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP2の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP2に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP2の検出方法を提供する。

【選択図】 なし



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1371号

通知年月日: 平成 10 年 10 月 29 日

扶桑薬品工業株式会社
取締役社長 戸田 幹雄

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 署 信



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p>E. coli pTrcHis/mBSSP2</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 17033</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p>■ 科学的性質</p> <p>■ 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 10 年 10 月 29 日に受領した1欄の微生物を受託する。</p>	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100062144

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ
ル 青山特許事務所

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ
ル 青山特許事務所

【氏名又は名称】 田中 光雄

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000238201]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名

扶桑薬品工業株式会社

